

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 12 月 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590790

研究課題名（和文） 肝細胞癌における新規 1q21 遺伝子増幅領域の解析

研究課題名（英文） Analysis of newly recognized amplified region in 1q21p in hepatocellular carcinoma

研究代表者

伊藤 義人 (ITO YOSHITO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70244613

研究成果の概要（和文）：

我々は現在まで肝臓癌に生じた遺伝子の変化が肝臓癌の増殖や生物学的な悪性度に関係していると考えて研究を進めてきている。その成果の一端として第1番染色体の長腕の1q21といわれる領域に遺伝子が増幅している場所があることを示した。現在までの研究で肝臓癌においてCREB3L4(cyclic AMP responsive element binding protein 3-like 4)遺伝子が増幅かつ発現亢進していることを確認している。

CREB3L4は、CREB/ATFファミリーに属する転写因子である。そこで、遺伝子増幅に伴うCREB3L4の発現亢進が肝臓癌細胞の増殖や生物学的な悪性度に及ぼす影響について、特にどのような下流遺伝子の転写活性を調節しているのかという観点からの検討をすすめた。

その研究の過程でtranscriptional co-factorであるP300の肝臓癌における発現が肝臓癌の脈管浸潤や肝内転移と関わることを見出した。さらに、P300の肝臓癌細胞の核において陽性の症例では生命予後が悪いことを明らかにした。また、in vitroにおける検討で、P300の肝臓癌細胞株における発現が細胞のepithelial mesenchymal transitionやcyclin D1/beta-catenin依存性の細胞増殖に関わることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We believed that the changes in the genomes derived from HCC were deeply involved in the growth or malignant transformation of HCC cells. We have already reported that CREB3L4 (cyclic AMP responsive element binding protein 3-like 4) located in 1q21p, which belonged to the CREB/ATF family, was amplified and was expressed in high levels in HCC samples. In the process of further research, we found that the nuclear expression of P300, a transcriptional co-factor, was associated with the vascular invasion and intrahepatic metastasis of human HCCs. Furthermore, we identified that high expression of P300 in HCC was associated with epithelial mesenchymal transition-like phenotypic change and cyclin D1/beta-catenin dependent growth of HCC cells which might explain the poor prognosis of the patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、高密度オリゴヌクレオチド・アレイを導入し、DNA コピー解析を推進してきた。このアレイにより、従来型 CGH では検出不可能であった微細な新規の遺伝子増幅領域やホモ欠失領域をピンポイントで検出することができるようになった。その成果の一端として第1番染色体の長腕の 1q21 という領域に遺伝子が増幅している場所があることが分かった。現在までの研究で、肝臓癌においては CREB3L4 (cyclic AMP responsive element binding protein 3-like 4) 遺伝子が増幅かつ発現亢進していることを確認している (Inagaki Y et al. Cancer Genet Cytogenet 2008)。CREB3L4 は、CREB/ATF ファミリーに属する転写因子であり、本研究では、この点に関して、さらなる解析を推し進めて行きたいと考えている。

(2) 藤田らは、肝細胞癌より癌遺伝である gankyrin (GKN) を単離し、その解析を進めることで肝細胞癌の発癌機構の解明を目指した (Nat Med 2000: 6: p 96, J Biol Chem 2003: 278: p 10668)。その過程で、今までに下記の点を明らかにした。(1) GKN が、検索した全ての肝細胞癌例で過剰発現している。(2) GKN を過剰発現させることで、線維芽細胞を癌化させることが出来る。(3) GKN の機能を阻害することで、癌化した線維芽細胞を死滅させることが出来る。

最近、我々は GKN の肝臓組織での発現が肝臓癌患者の予後に関わることを報告した。また、GKN のヒト肝臓組織における発現が初期の発癌過程に深く関連することも併せて報告している (Hepatology 2008: 47: p 493)。GKN に対する新たなモノクローナル抗体を作成し、ELISA 法による GKN の血清中の濃度を測定し、GKN が腫瘍マーカーとなり得るか否かを検討したが、十分な感度・特異度が得られなかった。その後の検討で、肝がん細胞株で GKN を過剰発現させた場合に P300 が過剰発現してくることを示した。今後、この P300 の発現を CREB/ATF ファミリーに属する転写因子との関連も含めて検討したいと考えている。

## 2. 研究の目的

(1) 高密度オリゴヌクレオチド・アレイを用いて、肝臓癌由来細胞株に生じた DNA コピー数変化を解析した結果、第1番染色体長腕 1q21 領域に新規の遺伝子増幅領域を見出した。この領域は肝臓癌において最も高頻度で増幅している染色体領域のひとつであるが、その増幅の標的遺伝子は不明であった。そこで本研究では、肝臓癌における新規 1q21 増幅領域について解析する。そして、新たな 1q21 増幅の標的遺伝子を同定し、肝臓癌におけるその機能と臨床病理学的意義を解明することを目的とする。

(2) 従来の研究の結果、我々は、GKN の肝臓組織での発現が肝臓癌患者の予後に関わることを報告した。最近、肝臓癌細胞株で GKN を過剰発現させた場合に P300 が過剰発現してくることを見出した。このことより、ヒト肝臓組織における P300 の発現が肝臓の生物学的特性に関わるか否かを検討することを主目的とする。特に、臨床的に患者の生命予後に関わる働きを果すか否かを検討する。また、CREB3L4 の発現とシグナル伝達のうえで関連するか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 高密度オリゴヌクレオチド・アレイによる解析：

GeneChip 100K (または 250K) アレイ (Affymetrix 社) を用いて DNA コピー数を定量する。このアレイは、全ゲノム領域を高密度にカバーする約 12 万個 (または 24 万個) の SNP 特異的オリゴヌクレオチド・プローブを搭載しており、極めて高い分解能で、癌に生じた DNA コピー数変化を定量的に解析することができる。これまでに肝臓癌由来細胞株 20 株を対象にアレイ解析を行った。本年度は、昨年に引き続き肝臓癌切除標本より抽出した DNA を対象に加え、アレイ解析を進める。昨年度の研究で、肝臓癌切除標本においても CGH では検出できなかった新規遺伝子増幅領域 1q21 領域に新規の遺伝子増幅を検出している。今後、さらに多数例を用いて最小の共通増幅領域 (amplicon) を限局化する。次いで、amplicon 内にある遺伝子すべてについて mRNA 量を定量し、その発現が亢進している遺伝子 (増幅の標的遺伝子) を絞り込む。

臨床検体における結果を肝癌胞癌由来細胞株の結果と比較する。

CREB3L4 および新規遺伝子の解析：現在まで肝臓癌において CREB3L4 遺伝子が増幅かつ発現亢進していることを確認している。CREB3L4 (cyclic AMP responsive element binding protein 3-like 4) は、CREB/ATF ファミリーに属する転写因子である。本年度は臨床検体での解析を進め、遺伝子増幅に伴う CREB3L4 の発現亢進が肝癌細胞に及ぼす影響について、特にどのような下流遺伝子の転写活性を調節しているのかという観点からの検討をすすめる。また、この領域の新たな増幅遺伝子に関する検討を行い、その遺伝子が肝癌細胞のどのような生物学的活性に関わっているのかを明らかにすべく研究を推進する。

#### (2) 肝癌における P300 の解析：

ヒト肝癌切除後の組織標本を用いて、肝癌組織の肝細胞における P300 の発現を検討する。肝癌細胞の 50%以上の核で免疫組織化学的に P300 が染色された場合を陽性、50%未満の場合を陰性と判定する。P300 陽性肝癌患者と陰性肝癌患者との間で臨床背景を比較検討する。各群における生存率を Kaplan-Meier 法で比較検討する。

肝癌細胞株に siRNA を導入し P300 の発現を低下させて肝癌細胞にみられる様々な遺伝子発現の変化を Western blotting、real-time PCR 法で検討する。In vitro で epithelial mesenchymal transition に基づく変化を migration/invasion assay で検討する。細胞数の変化や apoptosis を TUNEL 法で検討する。

#### 4. 研究成果

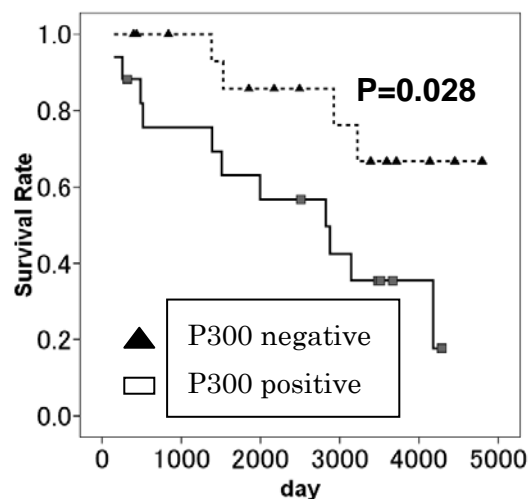
##### (1) 高密度オリゴヌクレオチド・アレイによる解析：

GeneChip 100K (または 250K) アレイ (Affymetrix 社) を用いて、昨年に引き続き肝癌切除標本より抽出した DNA を対象に加えアレイ解析を進めた。本年度は、昨年に引き続き、肝癌切除標本より抽出した DNA を対象に加えアレイ解析を進めた。昨年度の研究で、肝癌切除標本においても CGH では検出できなかった新規遺伝子増幅領域 1q21 領域に新規の遺伝子増幅を検出しているが、最終年度の集計では明らかな共通の結果は得られなかった。今後、さらに多数例を用いて最小の共通増幅領域 (amplicon) を限局化すべく検討したい。

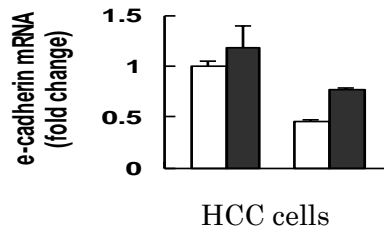
肝癌切除標本より抽出した DNA を対象とした CREB3L4 および新規遺伝子の解析：本年度は臨床検体での解析を進め、遺伝子増幅に伴う CREB3L4 の発現亢進が肝癌細胞に及ぼす影響について、特にどのような下流遺伝子の転写活性を調節しているのかという観点からの検討をすすめた。また、この領域の新たな増幅遺伝子に関する検討を行い、その遺伝子が肝癌細胞のどのような生物学的活性に関わっているのかを明らかにすべく研究を推した。しかしながら、最終結果として明確な研究結果を得ることができなかった。

##### (2) 肝癌における P300 の解析：

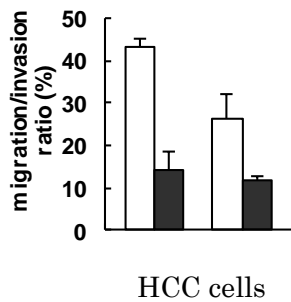
P300 の免疫組織化学的検討は肝細胞癌 44 症例、44 結節で行った。男性 30 名、女性 14 名、平均年齢 61.6 歳、肝細胞癌の分化度は、高分化型 12 例、中分化型 25 例、低分化型 7 例であった。P300 が肝癌細胞の細胞核に染色される割合が 50%以上を P300 陽性、50%以下を陰性とし、種々の臨床的パラメーターとの関連性を検討した。さらに、生命予後の追跡が可能であった 34 症例に関して P300 発現の有無による生存曲線の差を算出した。成績として、①P300 の肝細胞癌の核における発現と性別、腫瘍径、肝細胞癌の分化度、および、AFP 値の間には明らかな相関関係は認められなかったが、血管浸潤 (vp, vv, va) 及び肝内転移 (im) との間には有意な正の相関が認められた ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ )、②P300 陽性肝細胞癌 17 例と P300 陰性肝細胞癌 17 例の生存曲線を比較したところ、P300 陽性例では有意に予後が不良であった ( $p = 0.0384$ )。結果、肝細胞癌においては、核における P300 の発現と生命予後との間に負の相関関係が認められた。また、病理組織学的検討より、P300 の発現は肝癌細胞の脈管浸潤・肝内転移に深く関与しているものと考えられ、P300 が肝細胞癌の進展・予後に関わっていることが示唆された。



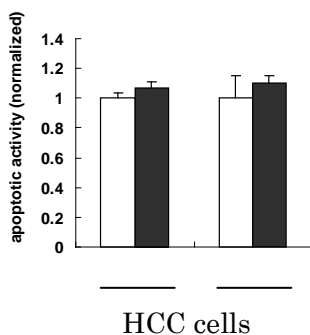
肝癌細胞株に P300 遺伝子の siRNA を導入し P300 の発現を低下させて肝癌細胞にみられる様々な遺伝子発現の変化を Western blotting、real-time PCR 法で検討した。特に、real-time PCR 法では e-cadherin の mRNA の発現亢進がみられた。



In vitro で肝癌細胞株に P300 遺伝子の siRNA を導入し P300 の発現を低下させて epithelial mesenchymal transition に関わる変化を migration/invasion assay で検討した。結果、migration/invasion 比が低下することが示された。



In vitro で肝癌細胞株に P300 遺伝子の siRNA を導入し P300 の発現を低下させて細胞数の変化を apoptosis activity で比較したが大きな変化を認めなかった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

1.Yokomizo C, Yamaguchi K, Itoh Y, Nishimura T, Minami M, Yasui K, Mitsuyoshi H, tochiki N, Fujii H, Nakajima T, Umemura A, Okanou T, Yoshikawa T. High expression of p300 in HCC predicts shortened overall survival in association with enhanced epithelial mesenchymal transition of HCC cells. *Cancer Lett* 310:140-147, 2011. (査読有)

〔学会発表〕 (計 3 件)

①Yokomizo C, Itoh Y, Yamaguchi k, Nishimura T, Okanou T, Yoshikawa T. High Expression of A Transcriptional Cofactor P300 in HCC Down-Regulates E-Cadherin, Promotes Tumor Invasion, And Predicts Shortened Overall Survival Of HCC Patients. 61th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD); Boston, USA. (2010.10.29-11.2)

②横溝千尋、山口寛二、新美敏久、西村 健、藤井秀樹、吉川敏一、伊藤義人。細胞癌におけるtranscriptional cofactor P300 の発現とその臨床的意義。第 47 回日本肝臓学会総会、2011 年 6 月 2 日～3 日、東京。

③Yokomizo C, Yamaguchi K, Nishimura T, N Tochiki, Fujii H, Nakajima T, Umemura A, Okanou T, Itoh Y. High expression of P300 in HCC is associated with EMT-like phenotypic change and cyclin D1/beta-catenin dependent growth of HCC cells which may underlie poor prognosis of the patients. 62th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD); San Francisco, USA. (2011.11.4-11.8)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 義人 (ITO YOSHITO)  
京都府立医科大学・医学研究科・  
准教授  
研究者番号：70244613

### (2) 研究分担者

安居 幸一郎 (YASUI KOHICHIROH)  
京都府立医科大学・医学研究科・  
准教授 (寄付講座)  
研究者番号：30323695